—Note—

A Rapid Method for Screening Transgenic Mice by PCR with Small Amounts of Blood

Hideaki TOJO and Masami KUBO

*Center for Laboratory Animal Experiment, Toyama Medical & Pharmaceutical
University, 2630 Sugitani, Toyama-shi, Toyama 930-01, Japan*

(Received 12 September 1990/Accepted 23 October 1990)

We report a rapid method for screening transgenic mice by polymerase chain reaction (PCR) with small amounts of blood. Ten to 50 μ l of the uncoagulated blood were collected from the transgenic mice carrying the human A γ / β -globin gene (8.9 kb, 13 and 53 copies) by puncturing the leg vein or cutting the tail end. Blood was mixed well with 200 μ l of the white blood cell separating-solution and was stood for 40 minutes. DNA was extracted from the blood cells in the supernatant and was used for PCR. When 10–20 μ l of blood were applied to the cell separating-solution and the blood cells that washed out from 10–20 μ l of the supernatant were used for PCR, the specific DNA band that amplified from the transgene was always detected by the electrophoresis with an agarose minigel.

微量血液を用いた PCR によるトランスジェニック マウスの迅速検出法

東 條 英 昭 ・ 久 保 政 美

富山医科薬科大学動物実験センター

外来遺伝子を導入したトランスジェニック (Tg) マウスは、今日、ヒトの遺伝病、癌、免疫不全症などの医学上重要な研究課題を、遺伝子レベルで解明してゆくための不可欠なモデルとなってきた。

ところで、Tg マウスの検出は、通常、尾部の一部から抽出した DNA を元に、DNA ドットプロット法やサザンプロット法によって行われている [1, 4, 5]。しかし、これらの方法によれば、DNA の抽出から結果の判定までには、少なくとも 3～4 日を要し、しかも、通常、アイソトープを使用するため、特別の設備が必要である。

今回、著者らは、微量の血液を試料として、polyme-

rase chain reaction (PCR) 法を利用した、迅速かつ簡便な Tg マウスの検出法を検討したので、その結果について報告する。

本実験では、著者らが作出したヒト A γ / β -グロビン遺伝子 (13および53コピー) をヘテロに保有する Tg マウス系 [5, 6] を供試した。

血液は、後肢の背中足静脈を22Gの注射針で穿刺する手段または尾部の先端を切断する手段によって出血させ、ヘパリン液で処理したプラスチック製チップで一定量 (10, 20, 30, 50 μ l) を採取した。採取した血液は、そのまま、あるいは白血球を分離してから解析に供した。白血球を分離する場合は、一定量の血液を、0.5ml

Table 1. Optimal amounts of blood applied to the blood cell-separation and of the supernatant used for PCR to detect the transgene

		Supernatant volume used for PCR ($\mu\ell$) ^a						
		Non-washed ^b				Washed ^c		
		1	2	3	5	10	20	30
Blood volume applied to cell-separation ($\mu\ell$)	10	○	○	△	×	○	○	△
	20	○	○	△	×	○	○	△
	30	○	○	△	×	○	×	×
	50	△	△	×	×	△	×	×

a : Blood was mixed with 200 $\mu\ell$ of the cell-separating solution and was stood for 40 min. b : Cells were not washed before used for PCR.

c : Cells were washed before used for PCR. ○ : DNA band was always detected. △ : DNA band was not always detected. × : DNA band was not detected.

用プラスチックチューブに入った200 $\mu\ell$ の白血球分離用溶液(15%ポリビニールピロリドン, 5%クエン酸ナトリウム)と混合, 攪拌したのち, 室温で40分間静置した。ついで, 上澄液の1, 2, 3および5 $\mu\ell$ を, 下層の赤血球を吸い込まないように注意し, それぞれ, 1.5ml用チューブに採り, 以下に示す手順で, 直接または血球を洗浄してからDNAの抽出およびPCRに供した。上澄液をそのまま使用する場合は, 採取した上澄液に, DNA抽出液(1.7 μM SDS, 20 μM MDTT, 0.5 mg/ml プロテアーゼKを含む1倍のPCR液)を, 全量が20 $\mu\ell$ になるように加え, 攪拌したのち, 37℃で1時間保持し, 血球細胞の溶解を行った。ついで, 85℃, 5分間の処理により, プロテアーゼKを不活化したのち, 80 $\mu\ell$ のPCR液(200 μM dNTP, 1.0 μM プライマー, 2.5単位 Taq I ポリメラーゼを含む1倍のPCR液)を加え, さらに, 反応液の蒸発を防ぐため, 70 $\mu\ell$ のミネラルオイルを重ねしPCRを行った[2, 3]。一方, 血球を洗浄してから使用する場合には, 採取した上澄液を約1.5mlの0.85% NaCl液で稀釈, 攪拌したのち, 12,000 rpm, 5分間遠心して血球を回収した。ついで, 血球沈渣に20 $\mu\ell$ のDNA抽出液を加え, 以後は, 前述した手順でDNAの抽出ならびにPCRを行った。

PCRは, プログラマブルサーマルシステム(アステック社, PC-700)を用いて, 94℃, 55℃(または65℃), 72℃, 各1分ずつのサイクルを20~30回実施した。なお, PCRに使用したプライマーは, Tgマウスに挿入

されている外来遺伝子のうち, ヒト β -グロビン遺伝子内の536 bpを増幅する22 mer と20 mer の合成オリゴヌクレオチドで, また, 増幅DNAの検出は, 反応液に100 $\mu\ell$ のクロロホルムと10 $\mu\ell$ の10倍BPB液を加え, 攪拌・遠心し, 上澄液の15 $\mu\ell$ を, エチジウムブロマイド(0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)を含む1.2%アガロースミニゲルの電気泳動(100V, 30分)によって行った。

まず, 血球分離後の上澄液中にどの程度の血球が含まれているかを測定した結果, 供試血液量が多くなるにしたがい, 血球数も多く, 白血球数は約12,000~34,000/ mm^3 で, 赤血球数は, 約64,000~352,000/ mm^3 であり, いずれの場合にも, 解析に十分な白血球数が含まれていた。つぎに, 採取した血液を, そのまま解析に使用した結果は, 血液量(1~10 $\mu\ell$)の違いに関係なく, 特異DNAバンドは全く検出されなかった。これは, 試料中に多くの赤血球が含まれていたために, DNAの抽出やPCRが阻害されたものと考えられる。一方, 血球を分離し, 白血球を多く含む上澄液の一部を, そのまま使用した場合と, 血球を洗浄してから使用した結果は, Table 1 および Fig. 1 に示したとおりである。

上澄液をそのまま使用した場合には, 血球分離に用いた血液の量および解析に用いた上澄液の量とが共に多い組み合わせで, DNAバンドの検出が不確実であったり, 全く検出されない結果が得られた。これは, 供試した上澄液中に残された赤血球数が多かったことや, 血球分離溶液の混入が, DNAの抽出やPCRに影響したものと推察される。これに対し, 血球を洗浄してから, 解析に供した際には, 同じく, 血球分離時の血液量と上澄液量とが多い組み合わせで, DNAバンドの検出が困難であった。この場合にも, 試料中の赤血球が関与したと考えられる。しかし, その他の条件では, 常にDNAバンドが検出された。なお, 本実験で使用したTgマウスの解析に関する限り, 挿入遺伝子のコピー数の違いによる結果の差異は認められなかった。

以上の結果, 微量の血液を材料として, 本実験で実施した条件によりTgマウスを検出するには, 10~30 $\mu\ell$ の血液を, 白血球の分離に供し, その上澄液の1~2 $\mu\ell$ をそのまま, または, 10~20 $\mu\ell$ 中の血球を洗浄してから解析に供するのが最適であると判明した。

ところで, 本実験に使用したTgマウスは, いずれも, 外来遺伝子が多数コピー挿入されたものである。そこで, 本方法が, 1コピーしか遺伝子を保有していないTgマウスの解析にも適用できるかどうかを調べるため, ヒトの血液を材料に, 同様な手法で検討した。その結果, 血球を分離し, 洗浄して用いた場合に限り, ほぼ

Tg マウスで得られた結果と同様な結果が得られた。また、PCR に使用したプライマーについては、アニーリングの温度を65℃に設定すれば、未精製のプライマーを用いても、良好な結果が得られることが判明した (Fig. 2)。

最後に、本実験では、供試した血液の量や血球分離後の上澄液の量を、種々変えて検討しているものの、血球分離用溶液の種類やその液量や濃度については一定であった。したがって、これらの条件をいろいろと変えて検

討すれば、さらに、より良い検出条件が得られるものと考ええる。

要 約

微量の血液を試料として、PCR による迅速なトランスジェニック (Tg) マウスの検出法を検討した。ヒト $A\gamma/\beta$ -グロビン遺伝子 (8.9 kb, 13および53コピー) を持つ Tg マウスの後肢静脈を穿刺または尾部の先端を切断す

Fig. 1. Detection of the transgene by PCR method with white blood cells separated from small amounts of blood of transgenic mice. Twenty five cycles of PCR was performed with the purified primers of 20-mer (5'-GCTCACTCAGTGTGGCAAAG-3') and 22-mer (5'-GGTTGGCCAATCTACTCCCAGG-3'), each cycle being 1 min. at 94°C, 1 min. at 72°C and 1 min. at 55°C. Fifteen μ l of the reaction mix was run on a 1.2% agarose minigel containing 0.5 μ g/ml ethidium bromide at 100 V, 30min. and was photographed under UV light. a : Blood volume (μ l) applied to cell separation b : Supernatant volume (μ l) used for PCR c : Blood cells were washed or not washed before used for PCR.

Fig. 2. PCR with the unpurified primers, in which the annealing of DNA extracted from white blood cells of transgenic mice was done at 55°C and at 65°C, respectively. Non-Tg : Sample of non-transgenic mouse a : Annealing in PCR was done at 65°C. b : Annealing in PCR was done at 55°C.

る手段により、凝固防止血液を10～50 μ l 採取し、200 μ l の白血球分離用溶液と混合したのち、40分間静置した。ついで、上澄液中の血球を用いて、DNA の抽出およびPCR を行い、増幅 DNA をアガロースミニゲルの電気泳動によって検出した。その結果、血液10～20 μ l を白血球分離に供し、その上澄液10～20 μ l 中の血球を洗浄して解析に供した場合に、特異 DNA バンドが常に検出された。

本実験の実施にあたり、九州大学遺伝情報実験施設服巻保幸助教授の援助を頂いた。また、本実験は、文部省科学研究費の重点領域研究 (01640505) と一般研究 B (63480078) により支援された。

文 献

- [1] Hogan, B., Costantini, F., and Lacy, E. (1986). Manipulating the Mouse Embryo. *In* A Laboratory Manual, pp 175-176.
- [2] Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., and White, T. J. (1990). PCR Protocols : A Guide to Methods and Applications, pp 13-20. Academic Press Inc.
- [3] Li, H., Gyllenstein, U. B., M. Cui, X., Saiki, R. K., Erlich, H. A., and Arnheim, N. (1985). *Nature*, **335**, 414-417.
- [4] Morahan, G., Brugliera, M., and Cox, K. O. (1989). *Nucl Acids Res.*, **17**, 3608.
- [5] Tojo, H., Momoi, K., Fukumaki, Y., and Ogita, Z. (1987). *実験動物*, **36**, 11-16.
- [6] Tojo, H., Fukumaki, Y., and Ogita, Z. (1988). *実験動物*, **39**, 347-350.